

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
증장기 Code	A	RIMS Code		2007B00110000009	
연구과제 및 세부과제		연구분야(Code)	수행기간	연구실	책임자
친환경 생물농약 개발연구		작물보호 LS0603	'00~'09	환경농업연구과	김성일
1) 고품질 채소생산을 위한 슈도모나스속 세균이용 기술개발		"	'05~'09	"	김성일
색인용어	슈도모나스, 길항작용, 병저항성유도, 영양흡수촉진, 동결건조, 병방제				

## ABSTRACT

To develop environment affinitive vegetable culture technique, antagonistic pseudomonads were collected from rhizoplane. The 6 isolates have plant growth promoting and plant disease control ability in vitro test, and grow on king's B agar plate with fluorescent pigment. According to Biolog identification system, they were identified as *Pseudomonas fluorescens* G, *P. fluorescens* F, *P. aurantiaca*, *P. marginalis*, *P. putida* B, *P. synxantha*. The bacterial cell harvested after emerge liquid culture in 300 ℓ fermentor improved seed germination rate by seed coating. The germination rate of heading lettuce was increased to 25% by *P. aurantiaca*, *P. marginalis*, *P. putida* B inoculation in nursery bed soil. In field test, they reduce disease incidence caused by *Erwinia carotovora*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Peronospora brassica*. The soft-rot severity of oriental cabbage in summer cultivation area reduced to 84% by *P. aurantiaca*, *P. marginalis* formulae treatment. The liquid medium to grow maximum cell product needed glucose, mannitol, glycerol, soybean meal, soytone, yeast extract addition. The composition of liquid fermentation media require glucose 10g/ℓ and yeast extract 25g/ℓ. *Pseudomonas* spp. formulae prepared by freeze dry did not harmful to animal and environment. The safety evaluation on *Pseudomonas* spp. formulae was carried out in compliance with the Testing Guidelines for Evaluation of Pesticides(Notificaton No. 2006-7 issued by Korea Rural Development Administration) and EPA guidelines(OPPTS, adopted;1996.2). *Pseudomonas* spp. formulae has no clinical signs and pathogenicity on acute oral/pathogenicity test, acute intravenous toxicity/pathogenicity test, acute dermal/pathogenicity test, acute dermal irritation test and skin sensitization test, acute eye irritation test. Males and females of SPF rat, Rabbit(NZW) and guinea pig showed same growth rate in body weight at the test period after the treatment.

## 1. 연구목표

채소류는 주로 생식용으로 재배되는 작물로 외관상 품질과 안전성이 소비에 큰 영향을 준다. 최근 안전농산물에 대한 관심이 증대되고 병해충방제에 사용된 농자재 중 잔류농약에 대한 검역체계가 강화되어 이를 해결 할 수 있는 대책마련이 시급히 요구되고 있다. 강원도 고랭지(해발 400m 이상)에서 여름철 고온기에 수확을 목적으로 재배되는 배추, 양배추, 결구상추는 국내 신선채소의 주 공급원이며 농가 주요소득 발작물이다. 그러나 고온 다습한 재배환경으로 병발생율이 높고, 이를 방제하기 위해 농약을 과다하게 사용함으로써 강원도 청정농산물에 대한 소비자들의 신용도가 극감하고 있는 실정이다.

본 연구는 화학농약에 의존하는 관행농법을 대신하여 토양에 서식하는 유용미생물을 이용한 생물적 방제기술을 활용함으로써 수량증대, 품질향상, 지력증진, 병저항성증대, 화학농약 사용량 최소화를 실현하고자 수행하였다. 연구대상 유용미생물로 슈도모나스속 세균을 선택한 이유는 여기에 속하는 세균종들이 근권에 정착하여 식물의 성장을 돕고 병방제 효과를 제공해주기 때문이다. 식물체생장촉진효과는 이들이 자라면서 분비하는 2차대사산물 중 킬레이트화합물은 토양에 있는 이온상태의 영양소흡수를 촉진하고, 식물생장호르몬을 분비하여 식물체의 성장을 촉진시킨다. 병방제 효과로는 항균물질생산을 생산하여 병원균의 성장을 억제하고, 식물이 근권에 분비한 영양성분을 소진시킴으로써 병원균의 정착을 방제하는 영양경쟁, 식물체 면역체계 강화에 의한 병원성병저항성유도 등의 기능을 수행하여 건강한 식물체생육에 도움을 주는 종들이 보고되어있다.

시험연구사업 추진을 위해 슈도모나스속 세균들은 파, 마늘, 양파, 배추, 결구상추의 근권에서 분리하여 배양하고, 식물생장촉진, 병방제 효과가 있는 균주를 선발하여 동정한 후 제품화를 위한 연구를 수행하고자하였다. 분리보존균주는 형태적 특성, 생화학적 분해능, 분해효소 등을 조사하여 동정하였다. 고품질채소재배에 사용가능한 슈도모나스 균주들은 제품화를 위해 필요한 Pilot대량배양을 위한 배지조성, 동결건조를 위한 균체수확방법, 제품화를 위한 증량제선발 시험 등을 수행하였다. 생산된 시제품들은 농가현지에 적용하여 효과를 확인하고, 효과가 확인된 시제품은 친환경 농자재 등록에 필요한 안전성검사기준(농촌진흥청 고시 2006-7호)에 준하여 동물, 어류, 미소동물에 대한 독성을 확인하여 이상 유무를 확인하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 슈도모나스속 균주 수집

배추, 양배추, 결구상추의 뿌리를 굴취하여 흙을 제거한 후 근권에 붙어있는 슈도모나스균을 분리하기 위해 수집한 시료는 0.85% 생리식염수에 30분간 진탕(4°C, 120rpm)하고, 연속 희석 한 후 King's medium B agar(MgSO<sub>4</sub> 1.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5g, Glycerol 15ml, Proteose peptone(Difco) 20g, D.W 1 l)평판배지에 0.1ml씩 도말 접종하였다. 도말 접종한 평판배지는 30°C 배양기에 5일간 배양하고 형성된 집락은 360nm 장파장 UV light로 조사하여 집락주변

에 형광물질을 형성한 집락들을 슈도모나스균으로 수집하였다. 수집된 균주는 사면배지에 옮겨 4℃ 냉장고에 보존하면서 시험재료로 사용하였다. 균주 동정은 Gram 염색, Catalase test, Oxidase test를 확인한 후 균체를 미생물동정시스템(Microlog™ system, release 4.2) kit에 접종하여 배양 한 후 발색유무를 판정하여 동정하였다.

#### 나. 균체처리에 의한 생육촉진 및 병방제 효과

보존중인 슈도모나스 균주들의 식물생장촉진효과를 조사하기 위해 액체 배양하여 증식하였다. 배양과정은 보존균주를 KB agar평판배지에 접종하여 배양한 후 형성된 집락에서 균체를 원형접종바늘로 떼어내어 seed 배양(KB액체배지 100ml/250ml 플라스크)하고, 증식된 균체는 1ℓ 플라스크, 20ℓ 간이배양기에 단계적으로 증식하여 배양시간을 단축하고, 생균밀도를 최대화하였다. 모든 배양과정은 25℃ 배양실에서 배양하였다. 균체를 포함하고 있는 배양액은 얼음을 채운 냉각수에서 4℃이하로 5시간 저온 처리하여 균체를 안정화시킨 후 원심분리(8,000rpm, 15분)하여 수확하였다. 원심분리로 가라앉은 균체는 4℃, 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 2회 세척하여 대사산물을 제거한 후 시험재료로 준비하였다. 슈도모나스균의 종자코팅처리에 의한 생장촉진조사를 위해 구입한 배추(고랭지여름배추), 양배추(오가네), 결구상추(그린볼구) 종자는 0.1% sodiumhypochloride용액에 10분간 침지한 후 멸균수에 3회 세척하여 표면 살균하였다. 준비된 종자는 0.1% Phytagel용액에 슈도모나스 균을  $10^7$ cfu/ml로 희석한 용액에 침지한 후 음건하였다.

#### 다. 미생물제품 생산기술개발을 위한 대량증식 조건 확립 시험

액체배양 중에 발효가 진행되는 상태에서 발효조 내 배양액에 미생물에 의해 섭취되는 포도당 농도를 조사하기 위하여 Glucose-lactate analyzer(YSI, USA)를 사용하여 분석하였다. 발효조로부터 일정량을 일정시간 간격으로 채취하여 원심분리한 후에 배양 상층액을 Glucose-lactate analyzer(YSI, USA)측정하여 glucose 섭취 양상을 조사하였다.

최대 균체량 생산을 위한 수확시기를 위해 배양 중 균체농도는 spectrophotometer (UVICON 430, Kontron Instruments, Italy)를 사용하여 배양액을 멸균증류수로 희석하여 600nm에서 흡광도를 측정하였다. 건조균체무게(Dry cell weight, DCW)는 발효조에서 10ml를 취하여 원심분리 후에 상등액은 버리고 생리 식염수로 반복 세척한 다음 일정량의 증류수에 현탁하여 95℃에서 40~50 시간 건조 시킨 후 desiccator에 보관하면서 측정하였다. 이 결과로 calibration curve를 작성한 다음 OD 수치를 DCW(dry cell weight)로 환산하였다.

Seed 배양을 위한 최적배지제조를 위해 M9 basal medium( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3g, NaCl 0.5g,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1g)를 기본으로 탄소원과 질소원 농도에 따른 성장정도를 측정하였다. 0.1% yeast extract 질소원을 기준으로 탄소원에 따른 성장 정도를 측정하고, 결정된 탄소원을 기준으로 최적 질소원을 결정하였다.

냉동 보관된 균주를 영양한천배지(nutrient agar plate)상에서 배양한 후 colony를 선택하여 200ml의 flask culture medium이 들어 있는 500ml baffled flask 에 접종하여 30℃, 150rpm으로 12시간 배양하여 준비하였다. 종균배양액을 2ℓ가 들어 있는 5ℓ jar fermentor

에 집중하여 본 배양을 실시하였다. 배양조건은 온도는 30℃, 통기량은 1vvm이며 교반 속도는 용존산소(Dissolved Oxygen)의 농도가 20%가 유지 되도록 100rpm에서 단계적으로 증가시켰다. 또한 발효중에 pH는 25% NH<sub>4</sub>OH를 사용하여 pH 7.0으로 유지되도록 하였으며 발효시 기포의 발생을 방지하기 위하여 소포제(silicon 303 & Neorin)를 발효 배지내에 첨가하였다.

5ℓ 발효조에서의 배양공정 최적화를 위하여 5ℓ jar fermentor (KFC5L; Korea Fermentor Co., Korea)를 사용하였다. 플라스크 배양에서의 최적 배지를 기본으로 5ℓ에서 최대 성장 배지 조건을 탐색하였다.

#### 라. 식물체의 영양분흡수촉진 킬레이트물질 생성능 측정

식물체의 영양분흡수를 촉진시켜주는 슈도모나속 균주들의 킬레이트화합물인 siderophore 생성량을 측정하기 위해 UV spectrophotometer를 이용한 흡광도측정법을 활용하였다. CAS assay 방법을 변형한 Fe-dye complex의 탈색정도로 siderophore의 생성 유무를 확인하고 UV scan을 통해 peak를 확인하였다. 배양액을 원심분리하여 cell을 제거하고 상등액을 millipore filter(0.25μm)를 사용하여 균체를 완전히 제거시키고 흡광도를 측정하였다. Fe-dye complex가 blue color를 나타내는데 siderophore가 첨가되면 dye에서 Fe가 이탈되면서 색이 orange color로 변색되는 것으로 siderophore 생성유무를 확인하였다.

#### 마. 슈도모나스 미생물제품 안전성조사

유용미생물을 이용한 농자재를 상품화하기 위해 필요한 안전성 확인을 위해 국내 지침자료로 “농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제 2006-7호)”과 미국의“US EPA OPPTS 870.1100(Acute oral toxicity), 870.1200(Acute dermal toxicity), 850.1075(Fish acute toxicity test, freshwater and marine)”을 참고하였다.

##### 1) 공시 시험동물

농촌진흥청고시 제2006-7호 농약의 독성시험기준과 방법에 제시한 Rat(SD계통-(주)오리엔트바이오)는 급성경구 및 병원성시험, 급성정맥 내 병원성시험, 급성경피 및 병원성시험, 잉어(Cyprinus carpio -경상북도 수산자원개발연구소 민물고기연구센터)는 담수어류에 대한 영향시험, 물벼룩(*Daphnia magna*)은 담수무척추동물에 대한 영향시험재료로 공시하였다.

##### 2) 순화 및 검역

Rat는 입수한 후 암·수 각 10마리를 검역·부검하여 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 미생물 등에 의한 오염여부를 확인한 후, 이상이 없는 나머지 동물은 동물실험실 사육환경 하에서 1주일 이상 순화시키면서, 피모상태 및 건강을 확인한 후 건전한 개체를 선별하여 시험에 이용하였다.

잉어는 실내에서 물의 순화, 여과를 시킬 수 있는 유리 수조 장치를 이용하였고, 시험용수는 지하수를 이용하여 수온 20 ~ 24℃, 조도 200 ~ 300lux의 범위 내에서 3주간 사육, 순화하였다.

### 3) 투여약량 수준설정

급성경구독성시험에서는 1,000mg/개체로 랫드의 체중이 약 250g인 것을 감안할 때 투여약량 4,000mg/kg, 급성경피독성시험에서는 기초시험투여 약량인 2,000mg/kg, 급성어독성시험에서는 기초시험농도 10mg/L의 수준에서 수행하였다. 실험동물수는 농약의 등록시험기준과 방법(농촌진흥청고시 제2006-7호)에 준하여 급성경구 및 경피시험에서 용량당 암·수각 5마리, 급성어독성시험에서 농도당 10마리를 이용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 가. 슈도모나스속 균주수집

KB agar 평판배지에 배양한 슈도모나스속 세균은 배양 3일 이후부터 균체 및 집락주변에 형광성을 띠는 물질을 분비하여 암실에서 자외선 등(366nm)으로 비취주면 형광이 관찰되었다. 형광물질 생산능에 준하여 분리 보존한 균주들은 모두 그람음성 균주들로 동정결과 6종이 확인되었다(그림 1). 동정된 *Pseudomonas fluorescens* 2종은 영양경쟁관계, 식물곰팡이병원균 생육억제항균물질생산, 영양소흡수촉진, 바이러스병에 대한 유도저항성이 있는 식물생장촉진 근권세균(PGPR, plant growth promoting rhizobacterium)으로 국내외에서 광범위하게 연구되어지고 있는 균종이다(표 1). 분리보존중인 6종은 모두 질소원이 풍부한 Nutrient agar, yeast extract agar와 탄소원이 풍부한 Potato dextrose agar모두에서 생육이 양호하여 토양 내 유기물분해에 도움을 주고 식물의 영양흡수에 촉매역할을 하는 것을 확인하였다.

표 1. 슈도모나스세균 배양시 생육특성

균주명	형광색소	배지상 생육특성			비고
		NA	YMA	PDA	
<i>P. fluorescens</i> G	연록색형광	양호	양호	양호	PGPR
<i>P. fluorescens</i> F	연록색형광	"	"	"	PGPR
<i>P. aurantiaca</i>	남색형광	"	"	"	unknown
<i>P. marginalis</i>	남색형광	"	"	"	unknown
<i>P. putida</i> B	연록색형광	"	"	"	PGPR
<i>P. synxantha</i>	무형광	"	"	"	PGPR

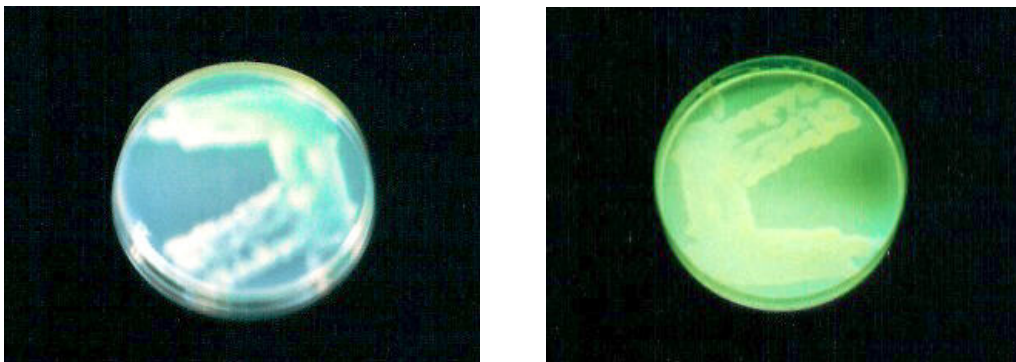


그림 1. 슈도모나스속 형광물질(좌:남색, 우:연록색)

## 나. 균체처리에 의한 생육촉진 및 병방제효과

슈도모나스 세균류의 식물생육촉진효과를 조사하기 위해 배양은 Seed배양은 250ml flask에 배지를 20ml 넣어 24시간배양하고, 1차 증식은 1000ml flask에 배지 400ml를 넣고 seed배양액 20ml를 접종하여 배양하였다. 실험에 충분한 균체를 확보하기위해 20 l fermenter에 배지 16 l를 넣고 1차증식 배양액 400ml을 접종하여 12시간 동양 폭기하면서 배양하였다(그림 2). 액체배지에서 단계적으로 배양한 슈도모나스균은 배양속도가 빠르고, 생균수가 충분히 확보되었다. 간이배양기에서 배양한 균체는 12시간 얼음물로 냉각( $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ )시켜 이분법으로 증식하는 균체가 single cell로 안전한 상태가 된 것을 확인한 후 원심분리하였다. 균체수확은 원심분리(8,000rpm, 20min,  $4^{\circ}\text{C}$ )하여 침전된 균체를 수확하고, 세척은 0.1M sodium phosphate buffer(pH 6.0)로 3회 세척하였다. 냉각처리와 buffer 용액을 이용한 균체수확은 수확과정에서 발생하는 균체사멸을 최소한으로 줄여주었다.



Seed 배양(20ml/250ml flask)



1차증식(400ml/1000ml flask)



대량배양(16 l / 20 l fermenter)



동결건조(NB+mannitol)

그림 2. 슈도모나스세균 증식효율 증대를 위한 배양과정

슈도모나스균주들의 종자발아 및 성장촉진효과를 시험하기위해 구입한 배추(고랭지여름배추, 불암3호), 양배추(오가네), 절구상추(그린볼구) 종자를 sodiumhypochlorite로 표면살균한

후 멸균수로 세척하여 건조시키고, 액체배양하여 세척한 균체는 0.1% Phytigel에  $10^7$ cfu/ml 농도로 현탁하였다. 준비된 종자는 슈도모나스 균체현탁액에 침지한 후 음건하여 파종하였다. 각 슈도모나스균 *P. fluorescens* biotype G, *P. fluorescens* biotype F, *P. aurantiaca*, *P. marginalis*, *P. putida* B, *P. synxantha*은 모두 무처리구와 오차범위내에서 차이가 없었으나 발아율이 낮은 결구상추는 *P. aurantiaca*, *P. marginalis*, *P. putida* B를 처리하였을 때 발아세가 크게 향상되었다(표 2).

표 2. 종자처리에 의한 프리그묘소질 증진효과

처리내용	발아율(%)			발아세(%)		
	배 추	양배추	결 구 상 추	배 추 파종4일후	양배추 파종4일후	결구상추 파종6일후
<i>P. fluoerescens</i> G	97.3	89.4	87.3	100	92.7	75.3
<i>P. fluorescens</i> F	95.4	90.2	84.7	100	97.4	68.7
<i>P. aurantiaca</i>	98.7	89.7	82.5	100	94.8	82.7
<i>P. marginalis</i>	93.4	88.4	92.3	100	92.6	80.4
<i>P. putida</i> B	96.1	92.1	85.7	100	93.4	79.3
<i>P. synxantha</i>	95.3	87.7	83.8	100	92.3	68.7
0.1% Phytigel	94.7	86.8	87.5	100	86.5	72.3
무처리(증류수)	96.3	91.7	85.4	100	87.4	56.7

균체를 동결건조하여 준비한 슈도모나스 제형물을 물에  $10^9$ cfu/ml 농도로 희석한 후 상토를 채운 128구 트레이를 침지처리하면 630/ml 정도 수분을 흡수하였으며 여기에 종자를 파종하면 양배추와 결구상추의 발아세가 크게 향상되어 *P. marginalis* 처리시 발아세가 26%증가되어 득묘율을 크게 향상시켰다(표 3).

표 3. 상토 세균처리효과

처리내용	발아율(%)			발아세(%)		
	배 추	양배추	결 구 상 추	배 추 파종4일후	양배추 파종4일후	결구상추 파종6일후
<i>P. fluoerescens</i> G	96.7	93.5	86.2	100	93.6	83.7
<i>P. fluorescens</i> F	94.7	87.4	82.4	100	97.2	76.4
<i>P. aurantiaca</i>	97.8	88.7	84.3	100	90.3	84.7
<i>P. marginalis</i>	95.4	91.2	86.5	100	94.7	84.0
<i>P. putida</i> B	92.7	94.3	87.3	100	92.3	82.4
<i>P. synxantha</i>	94.5	86.4	84.2	100	94.0	76.3
0.1% Phytigel	92.4	89.7	87.5	100	84.3	76.4
무처리(증류수)	97.2	87.4	86.3	100	86.3	58.4

고령지 해발 700m에서 재배하는 농가에서 주요채소작물에 발생하는 병은 배추와 양배추의 무름병(*Erwinia carotovora*), 결구상추의 균핵병(*Sclerotinia sclerotiorum*), 배추 노균병(*Peronospora brassica*) (그림 3)이며 이 병들에 대한 생물적방제를 위해 공시한 6종의 슈도모나스균을 동결건조하여 제품화하였다. 준비한 제품은 0.1% Phytigel용액 1,000배로 희석하였을 때 슈도모나스균 밀도는  $10^5$ cfu/ml였다. 엽면살포는 5월 중순 병이 발생하기 전 5일 간격으로 3회 살포하고 수확기에 병발생율을 조사하였다. 배추무름병의 경우 공시한 6균주 모두 적용약제와 오차범위 내에서 방제효과가 있었으며 *P. aurantica*는 방제효과가 높았다. 양배추의 무름병발생율은 6.4%였으며 수확 후 수송과정 10시간내에 자른 뿌리부위에서 감염에 의한 부패가 진행되어 피해를 주었으나 *P. fluorescens* biotype G, *P. fluorescens* biotype F, *P. aurantica*, *P. marginalis*를 처리한 양배추는 무름병발생율이 0%이고 수확후 저장중에도 병발생이 확인되지 않았다. 곰팡이병인 균핵병과 노균병은 *P. fluorescens* G 처리구에서 병발생이 크게 감소하였으며 결구상추의 균핵병은 적용약제 처리구보다 병발생율이 13% 낮았다(표 4).

표 4. 슈도모나스 세균 엽면살포에 의한 병방제효과

처리내용	무름병 <sup>1)</sup>		균핵병 <sup>2)</sup> (결구상추)	노균병 <sup>3)</sup> (배추)
	배추	양배추		
<i>P. fluorescens</i> G	1.4	0.0	13.4	26.1
<i>P. fluorescens</i> F	1.3	0.0	24.3	34.7
<i>P. aurantica</i>	1.0	0.0	22.7	28.7
<i>P. marginalis</i>	1.2	0.0	35.7	34.0
<i>P. putida</i> B	1.4	1.2	18.4	28.4
<i>P. synxantha</i>	1.2	1.4	42.5	31.4
0.1% Phytigel	2.7	2.3	64.2	32.3
무처리	8.5	6.4	68.4	46.7
일품	1.2	0.3	-	-
미리캣트	-	-	-	12.4
다찌가렌	-	-	26.3	-

※ <sup>1)</sup>:발병율(%), <sup>2)</sup>:발병율(%), <sup>3)</sup>:병반수/최장엽



무름병



노균병



정 상 주



균 핵 병



정 상 주



무 림 병

그림 3. 공시채소작물 주요병피해양상

평난지(춘천시 신북읍 발산리)에서 여름철 배추재배시험을 위해 비닐피복 2줄심기로 5월 하순에 정식하여 7월 3일 수확하였다. 무름병은 정식 후 23일부터 지온상승과 함께 무름병이 발생하기 시작하였으며 무처리구는 무름병발생율이 27%로 높았다. 고랭지배추재배지에서 무름병방제효과가 높았던 *P. synxantha*, *P. aurentica*, *P. marginalis*를 살포한 시험구는 발병율이 7.3%이하로 낮았으며 특히 *P. aurentica*, *P. marginalis*처리구는 무처리구 대비 방제가가 84%로 높았다(표 5).



그림 4. 여름철 평난지 배추무름병방제시험

표 5. 여름철 평남지 슈도모나스미생물제 처리에 의한 배추무름병 방제효과

시험구 번호	처리내용	발병율(%)			평균	방제가
		1반복	2반복	3반복		
1	무처리	32.3	21.3	27.3	27.0	-
2	<i>Pseudomonas synxantha</i>	8.2	2.9	10.7	7.3	72.9
3	<i>P. aurantifica</i>	6.3	1.7	5.3	4.4	84.8
4	<i>P. marginalis</i>	7.3	2.6	3.2	4.4	84.8

다. 미생물제품 생산기술개발을 위한 대량증식조건확립시험

1) 길항세균의 탄소원 조사

*P. putida* B의 탄소원 소비 특성을 조사하기 위하여 플라스크 배양을 통해 glucose, fructose, galactose, maltose, sucrose, lactose, cellobise, mannose, xylose, glycerol, arabinose, satrch, mannitol, dextrose등에 대한 선호도를 조사하였다. 같은 조건에서 탄소원만 달리 하여 30℃, 140rpm에서 배양 12시간, 24시간에서 세포 성장도를 측정하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 mannitol이 약 5.24OD 까지 성장을 하였다. 세포건조중량은 l 당 2.220g으로 다른 탄소원과 비교하여 가장 좋은 성장을 나타냈다. 그 다음 glycerol으로 세포 성장이 4.55OD로 세포건조 중량이 l 당 중량이 1.58g로 나타났다. 이것은 glucose 세포의 성장은 glycerol보다 약간 낮은 4.645OD이지만 세포건조 중량은 l 당 2.18g으로 더 많이 생산 되었다. 세포의 성장과 건조중량이 mannitol과 glycerol이 더 높게 나왔지만 kg당 가격이 산업용으로 활용하기엔 가격이 비싼 기질들이다. 따라서 이와 비슷한 수준의 세포 성장을 보이면서 산업적으로 사용하기에도 경쟁력이 우위인 glucose를 탄소원으로 1차 선정하였다(그림. 5)

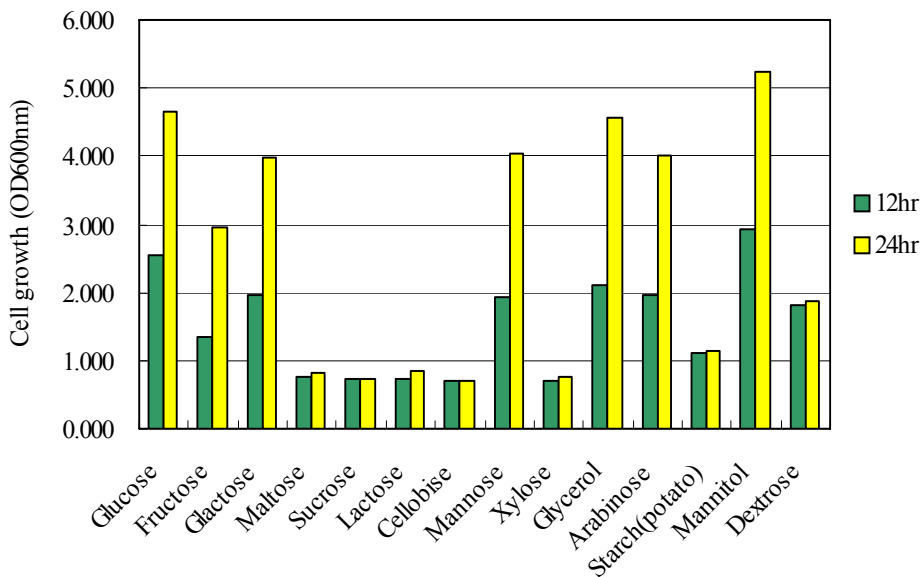


그림 5. *P. putida* B의 액체배양시 탄소원 첨가에 의한 성장속도

## 2) 길항세균의 질소원조사

길항세균의 질소원을 조사하기 위하여 soybean meal, proteose peptone, bato-peptone, peptone G, soytone, tryptone, yeast extract, hydrolyzed casein, (NH)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 등 다양한 질소원에 대한 영향을 조사하였다. 탄소원은 1%로 glucose로 기준으로 하고 위의 다양 질소원을 대상으로 하여 조사하고 세포의 성장도를 탄소원과 같이 12시간, 24시간 경과 하여 흡광도 600nm에서 측정하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 yeast extract는 세포의 성장이 4.845OD정도 자랐으며 soybean meal은 4.610OD정도 까지 자랐다. 하지만 soybean meal은 soybean meal 자체의 입자들 때문에 약간의 오차가 있다. 세포의 건조중량은 soybean meal과 yeast extract가 1당 1.77g으로 같게 나왔다. 그밖에 soytone에서 좋은 세포 성장을 나타냈다. 이와 같이 선발된 길항 세균은 콩을 원료로한 질소원 배지에서 잘 자라는 것으로 나타났다. 그러나 배지조제와 가격면에서 뒤지지 않은 yeast extract를 질소원으로 1차 선정하였다(그림. 6).

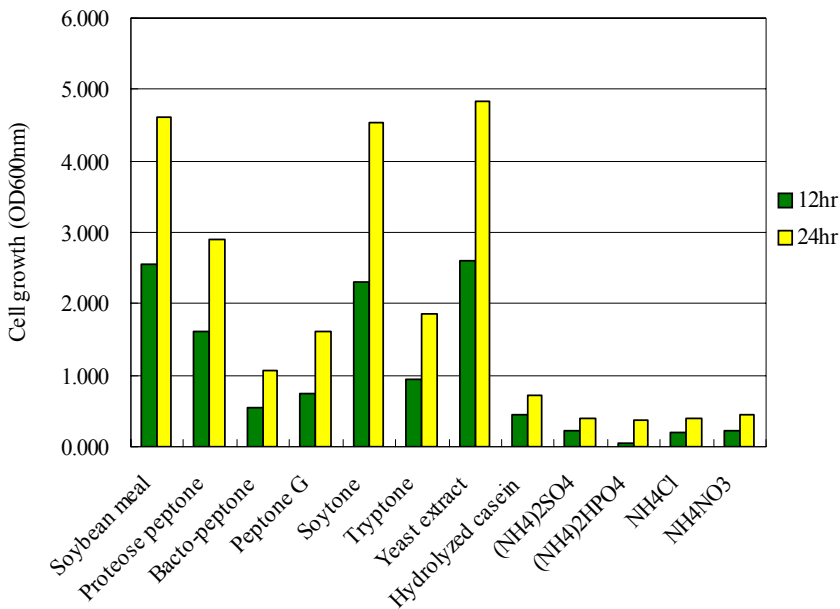


그림 6. *P. putida* B의 액체배양시 질소원 첨가에 의한 성장속도

## 3) 길항세균의 미량 원소에 대한 영향 조사

길항세균의 미량원소에 대한 영향을 조사하기 위하여 CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>, CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, MgCl · 6HO, MnCl · 4HO, CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> 등에 대하여 조사 하였다. 그 결과 FeCl<sub>3</sub>가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 나타났다. 세포의 성장은 다른 미량 원소보다 높은 5.155OD로 가장 잘 자랐다. 세포건조 중량은 1당 1.45g으로 나타났고 MgCl · 6HO는 약간 높은 1.53OD으로 나타났다. CaCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O와 CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> 등은 세포의 성장을 저해하는 것처럼 나타났다. 대조구는 미량원소를 사용하지 않고 탄소원과 질

소원 만을 사용하여 같은 조건에서 배양한 결과이다(그림 7).

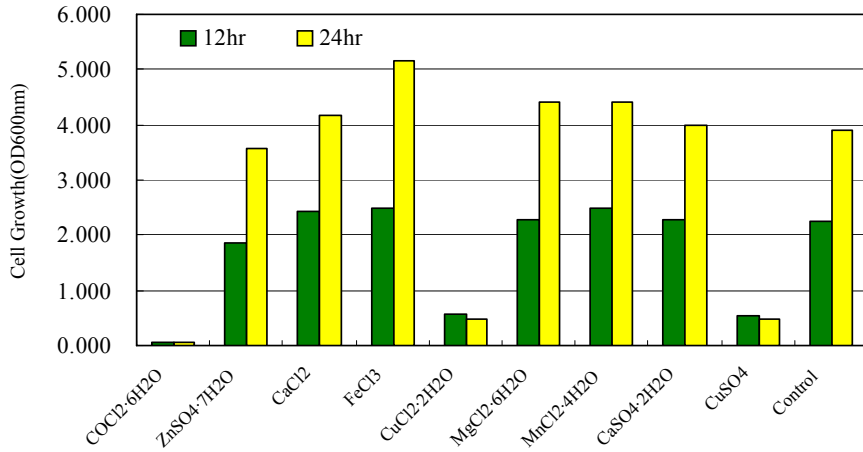


그림 7. *P. putida* B의 액체배양시 무기영양소 첨가에 의한 성장속도

#### 4) 탄소원 농도 변화에 따른 실험

탄소원 실험 결과 세포의 성장과 경제성을 고려하여 선정된 탄소원인 glucose이 길항 균주 성장의 농도에 따른 영향을 조사하였다. 다른 배양조건을 동일하게 하고 탄소원의 농도를 ℓ당 1, 3, 5, 10, 20, 30, 40, 50등의 농도로 변화 시켜 가면서 조사하였다. 그 결과 ℓ당 10g의 농도에서 24시간 경과 하여 세포의 성장이 3.4 OD정도까지 이르게 되었다(그림 8).

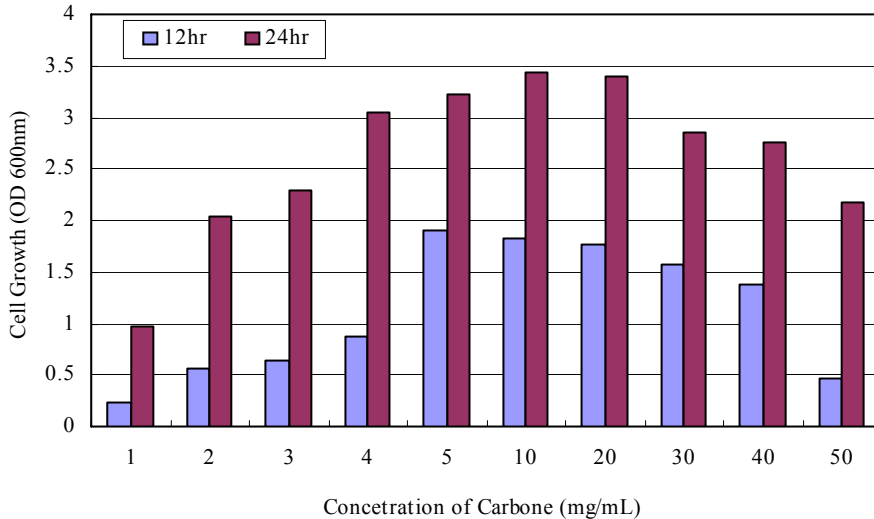


그림 8. *P. putida* B의 액체배양시 탄소원 최적농도

### 5) 질소원 농도 변화에 따른 실험

다양한 질소원에 대한 실험 결과 선정된 yeast extract 농도에 따른 길항 세균의 성장을 조사하기 위하여 glucose 농도를 10g/ℓ으로 고정하고 yeast 농도를 ℓ당 1, 2.5, 5, 10, 25, 50g로 변화하여 조사하였다. 12시간 경과하여 25g 첨가시의 세포 성장은 1.22OD로 50g첨가시 1.108보다 더 잘 자랐다. 하지만 24시간 경과 후에는 50g 첨가시는 세포의 성장이 더 이루어져 1.39OD까지 성장을 하였다(OD는 실제보다 10배 희석된 수치임). 전체적으로 세포의 성장은 질소원인 yeast extract량에 비례하여 증가하는 것으로 나타났다(그림 9).

세포의 건조 중량을 나타낸 그림에서 더욱 확실하게 yeast extract 농도에 비례하여 세포의 성장이 증가하는 것으로 나타난다. 세포건조 중량은 질소원인 yeast extract 50g 첨가시 세포건조 중량이 0.5g으로 가장 많은 세포를 생산하는 것으로 나타났다.

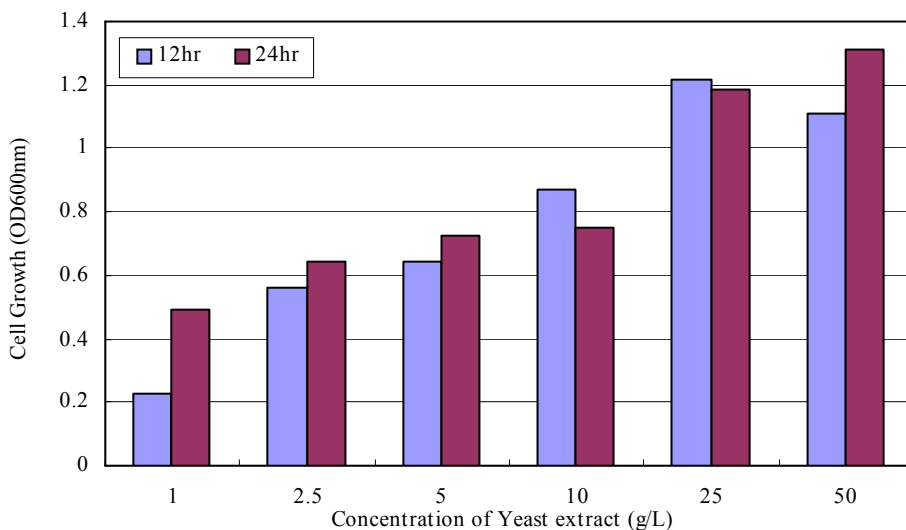


그림 9. *P. putida* B의 액체배양시 질소원 최적농도

### 6) 길항 세균의 pH에 따른 실험

길항세균의 성장에 최적pH를 조사하기 위하여 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5의 범위에서 5ℓ jar fermentor에서 각각 배양하여 세포의 성장을 비교하여 보았다. 배지와 배양 공정 조건을 동일하게 하고 온도는 30℃하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 pH 7.0에서 가장 좋은 성장을 나타냈다(그림 10). pH가 알카리 영역으로 갈수록 급격한 성장 저해가 일어났으며 산성 영역에서는 세포의 성장이 알카리 영역보다는 비교적 잘 자랐다. 대부분의 미생물이 중성영역에서 좋은 성장을 나타내는 것과 같이 길항세균도 중성인 7.0과 7.5영역에서 가장 좋은 세포 성장 양상을 나타냈다. pH 7.0에서 성장 양상은 배양 10시간 경과하여 최고의 성장을 나타냈으며 그 이후로 점차 감소하여 death phase로 진행되었다. 이 실험 결과를 통하여 길항 세균 배양 중 pH는 7.0으로 선정하였다.

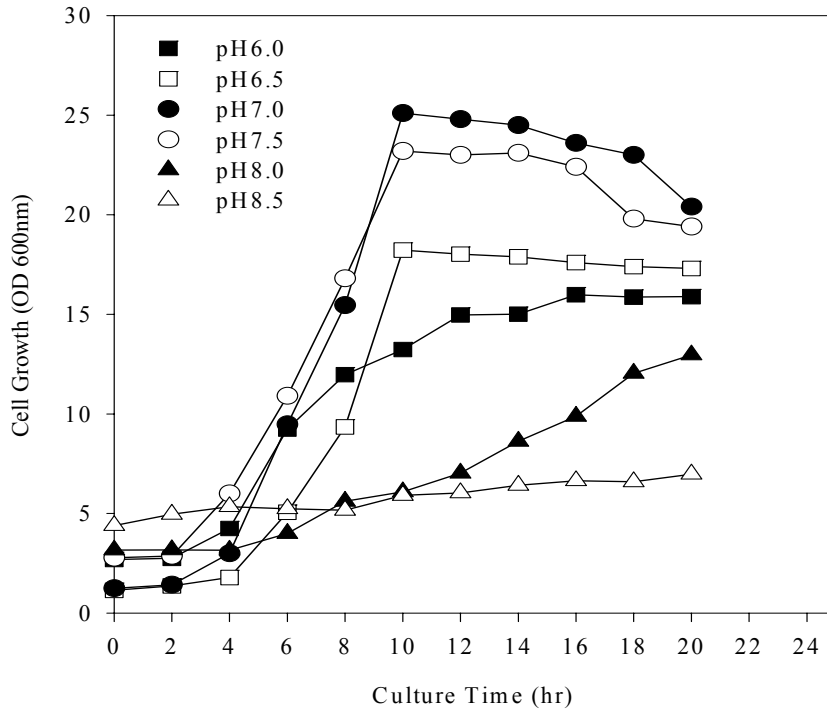


그림 10. *P. putida* B의 액체배양시 최적 pH

### 7) 길항 세균의 온도에 따른 실험

길항세균의 성장에 최적온도를 조사하기 위하여 25, 30, 35, 40℃의 범위에서 5 l jar fermentaor에서 각각 배양하여 세포의 성장을 비교하여 보았다. 배지와 배양 공정 조건을 동일하게 하고 pH는 7.0으로 조절하였다. 그 결과 다음의 그림과 같이 30℃에서 가장 좋은 균주의 성장을 보였다(그림 11). 40℃에서는 lag time이 8시간정도 까지 지속 되었으며 최고 성장도 15OD정도 까지 자랐다. 35℃에서는 비교적 40℃에서 보다 lag time이 짧았으나 최고 정장 정도는 40에서와 비슷한 수준인 14OD에 머물렀다. 25℃에서는 초기의 균성장은 초기는 비교적 다른 온도에서 보다 잘 자랐으나 최고 성장은 18OD에 이르고 이후로 사멸기로 들어갔다. 하지만 30℃에서는 배양 8시간 경과하여 30OD에 이르도록 성장하였다. 이후로 death phase로 들어가 최종 균주 OD는 18에 이르렀다.

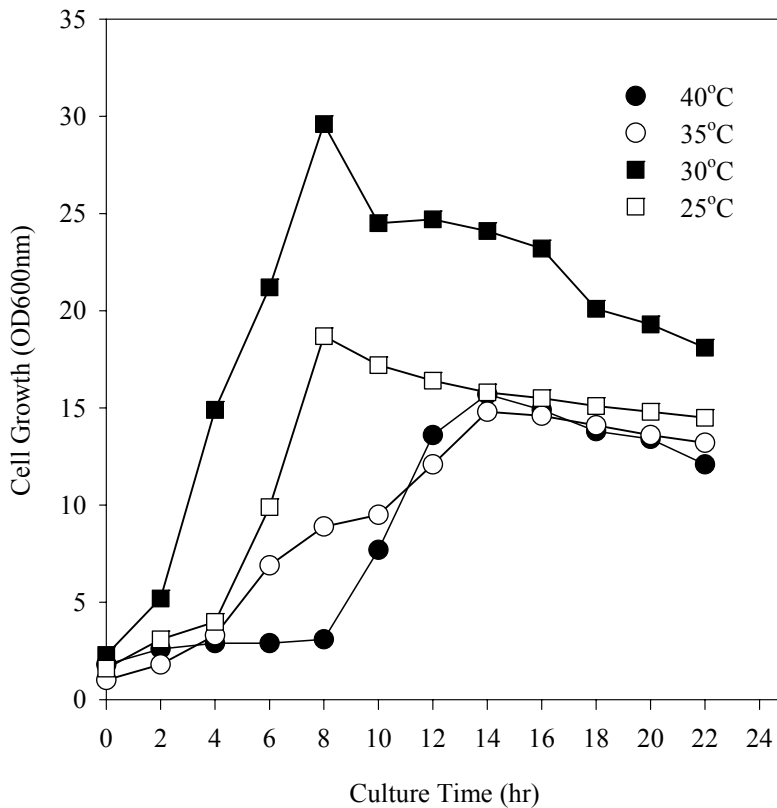


그림 11. *P. putida* B의 액체배양시 최적온도

#### 라. 식물체의 영양분흡수촉진 킬레이트생성능 측정

종배양은 5 l flask에 2 l volume으로 tryptic soy broth 로 준비하고 배양온도는 30℃, 140rpm에서 12시간 배양하여 준비하였다. 종배양액을 150 l가 들어 있는 300 l pilot plant fermentor(KFC 300, Korea Fermentor Co.)에 접종하여 본 배양을 실시하였다. 배양조건은 온도는 30℃, 통기량은 1vvm이며 교반 속도는 용존산소(Dissolved Oxygen)의 농도가 20%가 유지 되도록 100rpm에서 단계적으로 증가 시켰다. 또한 발효중에 pH는 NH<sub>4</sub>OH를 사용하여 pH 7.0으로 유지되도록 하였으며 발효시 기포의 발생을 방지하기 위하여 소포제(silicon 303 & Neorin)를 발효 배지내에 첨가 하였다. 300 l 발효조에서의 배양공정 최적화를 위하여 생명공학연구원 산업화 지원실 300 l pilot plant fermentor (KFC 300, Korea Fermentor Co.)를 사용하였다.

사용한 배지는 산업용 등급제품으로 5 l에서 최적화한 배지와 배양조건을 가지고 사용하였으며 성분(g/l)은 glycerol 60, yeast extract 30, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10, MgCl<sub>2</sub> 3.5 을 사용하였다. glycerol이 소진되는 시점에 30g/l로 2회 feeding 해 줌으로써 최대 세포성장을 유도하였다. 그 결과 최대 세포 성장농도는 80OD 이상을 나타냈고 siderophore 도 분비하였다(그림 12). siderophore 생성량의 측정은 간접적인 방법에 의해 정량하였다. 앞에서 언급했듯이 siderophore 생성배지인 KB 배지를 기준으로 생성량을 간접 정량하였다. 배양액을 5배 희석하여 403nm에서 최대의 흡수과장을 나타내는 값을 읽었다. siderophore 생성은 적정량의 Fe의 존재뿐만 아니라 배지의 배합비와 발효 조건 등에 크게 좌우되며 특히 어떤 배지를 사용하였는지에 따라 생성량에는 많은 차이를 보인다. 세포 농도 증가와 siderophore 생성량과는 완전한 정비례 관계에 있다고 볼 수는 없으며, 일정기간이 지나면 더 이상 증가를 보이지 않고 오히려 더 감소하는 경향이 있다. feeding 후에 생성배지 조건에 변화가 생겨 세포 농도는 높아지나 siderophore 생성량은 많아지지 않았다.

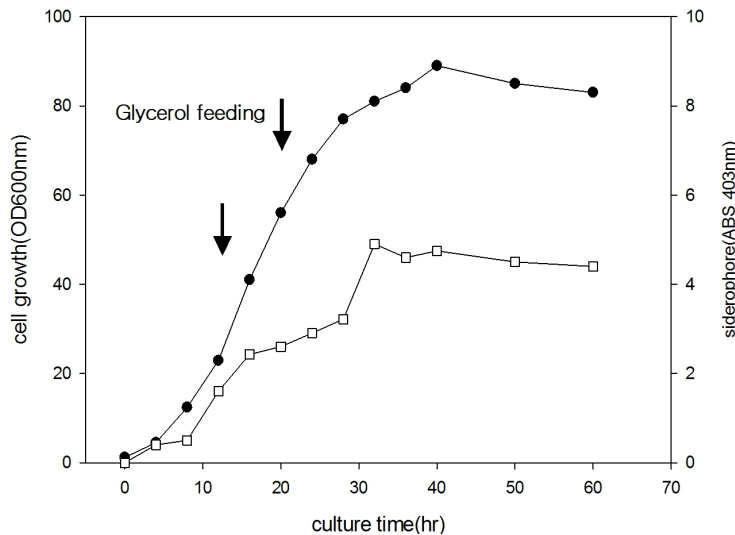


그림 12. *P. putida* B 배양기간 중 siderophore 생산량변화(●-균체, □-siderophore 농도)

#### 마. 슈도모나스 미생물제품 안전성조사

##### 1) 급성경구 및 병원성시험

시험에 사용된 개체들은 5~6주령(150g수준)의 SPF Rat(SD계통)으로 각 개체들은 하루전 날 절식시킨 후 원제를 1,000배로 생리식염수에 희석한 후 Rat 1마리당 1.5ml씩( $1.5 \times 10^8$ cfu/마리) 위 내에 강제투여하고, 4시간 후에 급이를 재개하면서 21일간 사육하였다. 사육 중 폐사, 활동둔화, 설사 등의 이상 증상은 관찰되지 않았으며 채변한 시료를 멸균수에 10배, 100배, 1,000배 희석한 후 0.1ml씩 선택배지(king's B agar)에 도말 접종하여 배양한 결과 형광성 세균집락은 관찰되지 않았다(표 6). 사육중인 개체들은 기간별로 도살(그림 13)하여 장기를 적출한 후 Bag mixer로 마쇄한 후 조식내 원제 방선균을 조사한 결과 관찰되지 않았다(표 7).

표 6. *P. putida* B의 분변 내 잔류검사

희석배수	cfu/plate					
	0일	1일	3일	7일	14일	21일
10배 희석	ND	ND	ND	ND	ND	ND
100배 희석	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1,000배 희석	ND	ND	ND	ND	ND	ND

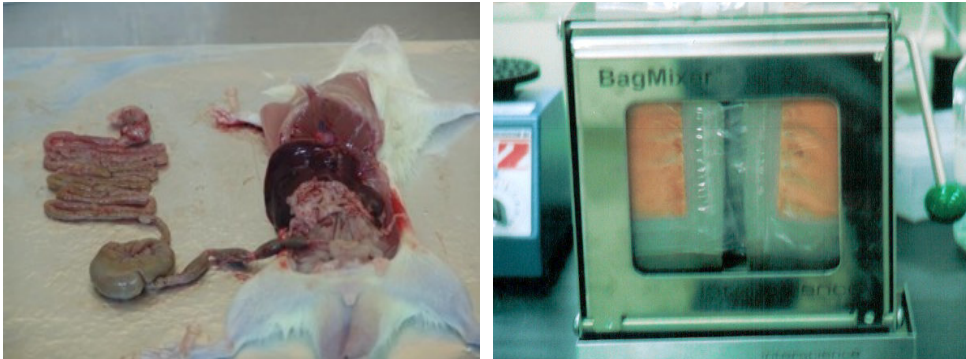


그림 13. 장기내 *P. putida* B 잔류검사

표 7. 장기내 *P. putida* B 잔류검사

경과일수	cfu/plate					
	Kidney	Brain	Liver	Lungs	Spleen	Blood
0일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21일	ND	ND	ND	ND	ND	ND

## 2) 급성정맥 및 병원성시험

급성경구 및 병원성시험에 사용한 SPF Rat를 공시시험동물로 사용하였으며 각 개체는 원제를 1,000로 희석한 후 미정맥에 1ml 주사하여 접종하였다. 원제를 접종한 개체들은 21일간 사육하면서 각 기간별로 암수 3마리씩 도살하여 혈액 및 장기내에 투입한 원제 균이 생존하는지 여부를 조사하였다. 접종 3일 후 개체에서는 혈액과 장기에서 원제방선균의 생존은 확인되지 않았다.

표 8. 장기 및 혈액 내 *P. putida* B 잔류검사

경과일수	cfu/plate					
	Kidney	Brain	Liver	Lungs	Spleen	Blood
0일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
14일	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21일	ND	ND	ND	ND	ND	ND

### 3) 급성경피 및 병원성시험

시험에 사용된 토끼는 NZW계통으로 2kg정도의 암수 5마리씩 공시하여 수행하였다. 원제를 피부에 도포하여 처리한 후에 피부염이나 기타 이상 징후는 관찰되지 않았다.

### 4) 담수어류에 대한 영향시험

시험에 사용된 잉어는 3g 수준의 *Cyprinus carpio*로 수조에 사용된 지하수는 pH 7.8, DO 11.3인 일급수이었다. 수조에 접종한 원제의 밀도는  $10^6$ spores/ml가되게 접종한 다음 수조 당 2마리씩 넣어 주고 3일간 사육하면서 치사여부를 관찰하였다. 사육기간 동안 물의 pH는 7.8~7.9일정하였고, 산소요구량도 3일 후에도 11.1로 유지되었다(표 9). 시험기간 동안 잉어의 유영상태나 먹이섭취에 이상증상은 관찰되지 않았다.

표 9. 잉어 수조 수질측정 및 누적치사수

구 분	1시간	24시간	48시간	72시간
누적치사수	0	0	0	0
증상	정상	정상	정상	정상
pH	7.8	7.9	7.8	7.9
DO	11.3	11.1	12.0	11.1

### 5) 담수무척추동물에 대한 영향시험

시험에 사용한 공시동물은 물벼룩(*Daphnia magna*)으로 pH 8.2, DO 10.2인 지하수를 넣은 수조에 원제를  $10^6$ cfu/ml 밀도로 접종한 다음 수조 당 10마리를 넣어 주고 누적치수를 조사하였다. 처리 6일 후 2개체가 치사하였으나 나머지 개체들은 정상적인 활동을 보였다(표 10).

표 10. 물벼룩 누적 치사수 및 수질측정

구 분	1시간	1일	2일	3일	6일	7일
누적치사수	0	0	0	0	2	2
증상	정상(10)	정상(10)	정상(10)	정상(10)	정상(8)	정상(8)
pH	8.2	-	8.1	8.1	8.1	8.1
DO	10.2	9.7	9.5	9.5	10.1	9.6

#### 6) *P. putida* B의 동물 및 환경에 대한 안전성평가

치사동물 및 LD<sub>50</sub>값은 각각의 경구, 경피 및 어독성 처리약량에서 전 시험 기간 동안 치사개체없이 모두 생존하였다. 따라서 반수치사약량(LD<sub>50</sub>)은 > 4,000mg/kg(경구) 및 > 2,000mg/kg(경피), 반수치사농도(LC<sub>50</sub>) > 10mg/L로 독성분류상 저독성으로 확인되었다. 약제 투여와 관련한 특이한 임상증상은 시험기간 동안 없어 일반중독성없고, 급성경구 및 경피독성시험에 이용된 동물의 D0, D1, D3, D7, D10, D14일 췌의 개체별 체중기록을 조사한 결과 약제투여군은 대조군과 비교하여 유의성 없이 대체로 증가하는 경향을 보였다. 부검소견으로 급성경구 및 경피독성 시험 종료 후 생존한 전 개체에 대한 육안적 부검을 실시한 결과 전 개체에서 특이한 부검소견은 관찰되지 않았다. 이상의 결과 *P. putida* B를 이용한 미생물제품은 저독성으로 확인되었다.

## 4. 적 요

친환경 채소생산을 위해 필요한 생물적 방제기술 개발을 위해 토양에서 분리한 슈도모나스속 세균 6종은 식물촉진과 병방제 효과가 확인되어 친환경 채소생산을 위한 미생물제품생산 원재로서 적합하였다.

- 가. 근권토양에서 분리한 토양미생물 중 슈도모나스속 세균 6종은 King's B agar배지에 배양하면 형광색소를 생산하여 366nm UV light로 조사하면 연록색 또는 남색의 형광을 발하였다. 세균동정장치를 이용하여 동정한 결과 *Pseudomonas fluorescens* G, *P. fluorescens* F, *P. aurantiaca*, *P. marginalis*, *P. putida* B, *P. synxantha* 6종으로 확인되었다.
- 나. 분리된 균주들은 액체배양이 가능하고 균체를 수확하여 종자에 코팅처리하면 발아율과 발아세가 증대되어 득묘율을 높여주고, *P. aurantiaca*, *P. marginalis*, *P. putida* B 3균주는 상토에 혼화처리하면 발아세가 낮은 작물의 발아세를 25% 높여주었다.
- 다. 공시한 슈도모나스균주들은 균핵병, 노균병에 대한 병방제 효과가 있었으며 배추무름병에 대한 방제효과는 평년지 여름철 재배지에서 방제효과가 높았으며 *P. aurantiaca*, *P. marginalis* 처리구에서 84%의 높은 방제효과를 확인하였다.
- 라. 액체배양시 요구되는 배지영양원 실험결과 탄수화물은 glucose, glycerol, mannitol 질소원은 soybean meal, soytone, yeast extract 첨가시 성장이 왕성하였다. 최적영양원 농도는 glucose는 ℓ 당 10g, yeast extract는 ℓ 당 25g으로 확인되었다. 배양온도는 30℃

에서 8시간 후에 최대생균수 밀도에 도달하였으며 pHsms 7.0 이하로 유지시켜 주어 야하였다.

- 마. 슈도모나스 제형제품은 동결건조하여 제조하였으며 안전성을 확인결과 동물과 환경에 무해하였다. 농진청고시 2006-7호와 미국 EPA조사기준에 준하여 안전성을 확인한 결과 경구, 경피, 안점막 시험에서 병원성이 없었고, 경피 및 물벼룩, 잉어에 안전하여 환경유해성이 없는 저독성으로 확인되었다.

## 5. 인용문헌

- Buyer, J. S., L. J. Sikora, and R. L. Chaney. 1989. A new growth medium for the study of siderophore-mediated interactions. *Biol. Fertil. Soils* 8:98-101.
- Dhanvantari B.N. (1990): Stem necrosis of greenhouse tomato caused by a novel *Pseudomonas* sp. *Plant Disease*, 74: 124.127.
- Harris, W. R., C. J. Carrano, and K. N. Raymond. 1979. Coordination chemistry of microbial iron transport compounds. 16. Isolation, characterization and formation constants of ferric aerobactin. *J. Am. Chem. Soc.* 101:2722-2727.
- Jurkevitch, E., Y. Hadar, and Y. Chen. 1992. Differential siderophore utilization and iron uptake by soil and rhizosphere bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:119-124
- Kloepper, J. W., M. N. Schroth, and T. D. Miller. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70:1078-1082.
- Loper, J. E., and M. D. Henkels. 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:99-105
- Lubeck, P. S., M. Hansen, and J. Sorensen. 2000. Simultaneous detection of the establishment of seed-inoculated *Pseudomonas fluorescens* strain DR54 and native soil bacteria on sugar beet root surfaces using fluorescence antibody and in situ hybridization techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33:11-19
- Malathrakis N.S., Goumas D.E. (1987): Bacterial soft rot tomato in plastic greenhouses in Crete. *Annals of Applied Biology*, 111: 115.123.
- Marugg, J. D., M. H. W. P. van Spanje, B. Schippers, and P. J. Weisbeek. 1985. Isolation and analysis of genes involved in siderophore biosynthesis in plant-growth stimulating *Pseudomonas putida* WCS358. *J. Bacteriol.* 164:563-570
- Nielsen, M. N., J. Sorensen, J. Fels, and H. C. Pedersen. 1998. Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3563-3569.

- Paa AS 1998. Formulation of beneficial organisms applied to soil. In: Burges HD ed. Formulation of microbial biopesticides. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Pp. 235-254.
- Paulitz, T. C., and J. E. Loper. 1991. Lack of a role for fluorescent siderophore production in the biological control of *Pythium* damping-off of cucumber by a strain of *Pseudomonas putida*. *Phytopathology* 81:930-935
- Raaijmakers, J. M., I. van der Sluis, M. Koster, P. A. H. M. Bakker, P. J. Weisbeek, and B. Schippers. 1995. Utilization of heterologous siderophores and rhizosphere competence of fluorescent *Pseudomonas* spp. *Can. J. Microbiol.* 41:126-135
- Shah-Smith DA, Burns RG 1997. Shelf-life of a biocontrol *Pseudomonas putida* applied to sugar beet seeds using commercial coatings. *Biocontrol Science and Technology* 7: 65-74.
- Shanahan, P., D. J. O'Sullivan, P. Simpson, J. D. Glennon, and F. O'Gara. 1992. Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:353-358.
- Thrane, C., T. H. Nielsen, J. Sorensen, and S. Olsson. 2001. *Pseudomonas fluorescens* DR54 reduces sclerotia formation, biomass development, and disease incidence of *Rhizoctonia solani* causing damping-off in sugar beet. *Microbiol. Ecol.* 42:438-445.

## 6. 연구결과활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2009(5년차)	기술이전	생육촉진 및 병저항성유도를 위한 슈도모나스균 제형화기술
2009(5년차)	기술실시계약	<i>Pseudomonas putida</i> 10301을 이용한 배추무름병방제

## 7. 연구원편성

구 분	소 속	직 급	성 명	수행업무	참여년도
책 임 자	강원도농업기술원	지방농업연구사	김성일	과제 총괄	05~09
공동연구자	강원도농업기술원	농업연구관	강안석	연구지원	07~09
공동연구자	강원도농업기술원	지방농업연구사	최준근	자료분석	07~09
공동연구자	강원도농업기술원	지방농업연구사	문윤기	문헌수집 및 조사	07~09